

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 8 月 26 日 (26.08.2004)

PCT

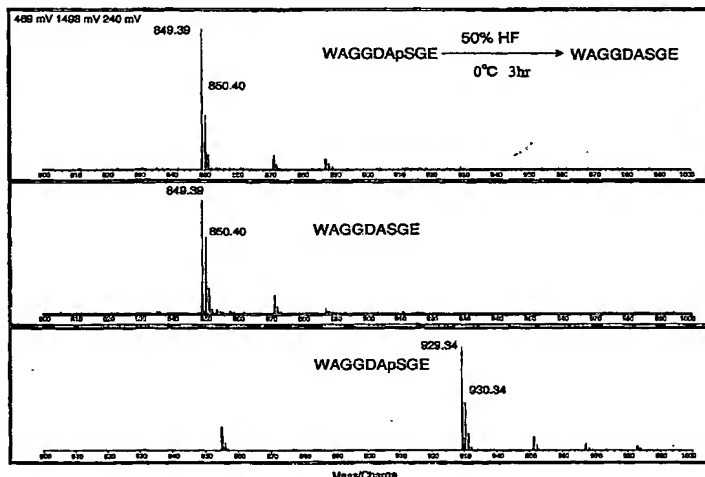
(10) 国際公開番号  
WO 2004/072106 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07K 1/113, 7/06, 7/08, G01N 33/68, 27/62
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/004305
- (22) 国際出願日: 2003 年 4 月 3 日 (03.04.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-36472 2003 年 2 月 14 日 (14.02.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社島津製作所 (SHIMADZU CORPORATION) [JP/JP]; 〒604-8511 京都府 京都市 中京区西ノ京桑原町 1 番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 九山 浩樹 (KUYAMA, Hiroki) [JP/JP]; 〒604-8511 京都府 京都市 中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 戸田 千香子 (TODA, Chikako) [JP/JP]; 〒604-8511 京都府 京都市 中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 西村 紀 (NISHIMURA, Osamu) [JP/JP]; 〒604-8511 京都府 京都市 中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 岡田 正広 (OKADA, Masahiro); 〒540-0010 大阪府 大阪市 中央区材木町 1 番 6 号 第 1 2 新興ビル 10 階 岡田正広特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF ELIMINATING PHOSPHATE GROUP OF PEPTIDE AND METHOD OF ANALYZING PEPTIDE

(54) 発明の名称: ペプチドのリン酸基を脱離する方法及びペプチドの解析方法



(57) Abstract: It is intended to provide a method of eliminating a phosphate group of a peptide by a chemical treatment without resort to any enzymes and a method of efficiently analyzing a peptide by using the above method. Namely, a method of eliminating a phosphate group of a peptide by using a reagent containing at least one member selected from the group consisting of hydrogen fluoride, hydrofluoric acid and a hydrogen fluoride-containing compound, and a method of analyzing a peptide by using this method. As the hydrogen fluoride-containing compound, it is preferable to employ hydrogen fluoride-pyridine. The elimination of a phosphate group of a peptide is carried out by controlling the total amount of hydrogen fluoride in hydrogen fluoride, hydrofluoric acid and the hydrogen fluoride-containing compound contained in the reagent to 10 to 100% by weight at a reaction temperature of -10 to 50°C. The analysis of a peptide is carried out preferably by mass spectroscopy with the use of MALDI-TOFMS.

(57) 要約: 酵素を用いずに化学的処理によってペプチドのリン酸基を脱離する方法及びその方法を用いてペプチドの解析を効率良く行う方法を提供する。フッ化水素、フッ化水素酸、及びフッ化水素含有化合物からなる群から選ばれる少なくとも1つを含む試剤を用いてペプチドのリン酸基を脱離する方法、及びその方法を用いたペプチドの解析方法。フッ化水素含有化合物は、好ましくはフッ化水素-ピリジンを用いる。ペプチドのリン酸基の脱離

[続葉有]



WO 2004/072106 A1



DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

は、試剤に含まれるフッ化水素、フッ化水素酸中のフッ化水素、及びフッ化水素含有化合物中のフッ化水素の合計量が、試剤に対し10～100重量%となるように用い、-10～50℃の反応温度で行う。またペプチドの解析は、好ましくはMALDI-TO FMSを用いた質量分析によって行う。

## 明 細 書

### ペプチドのリン酸基を脱離する方法及びペプチドの解析方法

#### 技術分野

本発明は、タンパク質化学及びペプチド・タンパク質の質量分析学に関する。

。

#### 背景技術

多くのタンパク質は、ゲノムから転写、翻訳された後、さらに修飾（翻訳後修飾）されることでその活性や機能が調節されている。翻訳後修飾反応としては、リン酸化、硫酸化、アセチル化、糖付加、脂質修飾等が挙げられるが、特にリン酸化反応は、細胞内情報伝達、細胞内代謝活性、細胞周期等を制御する重要な役割を担っている。したがって、このような翻訳後修飾形態を有するタンパク質を解析することは、タンパク質の機能を理解する上で大変重要である。

。

例えば、リン酸化修飾を受けたタンパク質の解析を行う場合、脱リン酸化がしばしば行われる。従来、この脱リン酸化は、アルカリ性フォスファターゼ等の酵素を用いて行われてきた。しかし、解析するタンパク質によっては、酵素の基質特異性や構造依存性等が原因して脱リン酸化が不完全に起こるという問題がある。

一方、リン酸化された糖鎖を、フッ化水素酸を用いて脱リン酸化する方法が知られている（例えば、非特許文献 1 ～ 3 参照。）。

非特許文献 1      イー・ファックス (E. Fuchs)、シー・ジルバーク (C. Gilvarg) 著、「アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)」、(米国)、第 90 巻、1978 年、p. 465 - 473

非特許文献2 シー・ジェイ・リー (C. J. Lee)、ビー・エー・フレイサー (B. A. Fraser) 著、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、(米国)、第255巻、1980年、p. 6847-6853

非特許文献3 エル・アール・フィリップス (L. R. Phillips)、オー・ニシムラ (O. Nishimura)、ビー・エー・フレイサー (B. A. Fraser) 著、「カルボハイドレート・リサーチ (Carbohydrate Research)」、(米国)、第121巻、1983年、p. 243-255

#### 発明の開示

##### 発明の目的

そこで、本発明の目的は、酵素を用いずに化学的処理によってペプチドのリン酸基を脱離する方法及びその方法を用いてペプチドの解析を効率良く行う方法を提供することにある。

##### 発明の概要

本発明者らは、鋭意検討した結果、ペプチドを、フッ化水素、フッ化水素酸、及びフッ化水素含有化合物からなる群から選ばれる少なくとも1つを含む試剤と反応させることによって上記目的が達成されることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、フッ化水素、フッ化水素酸、及びフッ化水素含有化合物からなる群から選ばれる少なくとも1つを含む試剤を用いてペプチドのリン酸基を脱離する方法である。

なお、本明細書においてペプチドとは、タンパク質を含む意味で用いる。

本発明は、前記フッ化水素含有化合物がフッ化水素-ピリジンである、前記のペプチドのリン酸基を脱離する方法である。

本発明は、前記試剤に含まれる前記フッ化水素、前記フッ化水素酸中のフッ化水素、及び前記フッ化水素含有化合物中のフッ化水素の合計量が、前記試剤に対し10～100重量%である、前記のペプチドのリン酸基を脱離する方法である。

本発明は、脱離の反応温度が $-10\sim 50^{\circ}\text{C}$ である、前記のペプチドのリン酸基を脱離する方法である。

本発明は、脱離の反応を液相反応又は気相反応で行う、前記のペプチドのリン酸基を脱離する方法である。

本発明は、前記のペプチドのリン酸基を脱離する方法を用いたペプチドの解析方法である。

本発明は、質量分析を用いる、前記のペプチドの解析方法である。

質量分析には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)及び飛行時間型質量分析法(TOFMS)を用いることが好ましい。

本発明は、フッ化水素、フッ化水素酸、及びフッ化水素含有化合物からなる群から選ばれる少なくとも1つを含む試剤を用いてペプチドのリン酸基を脱離することで見出されるペプチドを含む新規化合物である。

本発明は、前記得られた新規化合物から開発される医薬品候補化合物である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、配列表の配列番号1に記載のホスホペプチド、そのホスホペプチドをフッ化水素によって脱リン酸化して得られた配列表の配列番号2に記載のペプチド、及び別途調製された配列番号2と同じ配列を有するペプチドの、MALDI-TOFMSスペクトルチャートの比較図である。

図2は、配列表の配列番号3に記載のホスホペプチド、そのホスホペプチドをフッ化水素によって脱リン酸化して得られた配列表の配列番号4に記載のペプチド、及び別途調製された配列番号4と同じ配列を有するペプチドの、M

MALDI-TOFMSスペクトルチャートの比較図である。

図3は、配列表の配列番号5に記載のホスホペプチド、そのホスホペプチドをフッ化水素によって脱リン酸化して得られた配列表の配列番号6に記載のペプチド、及び別途合成した配列番号6と同じ配列を有するペプチドの、MALDI-TOFMSスペクトルチャートの比較図である。

図4は、配列表の配列番号1に記載のホスホペプチド、及びそのホスホペプチドをフッ化水素-ピリジンによって脱リン酸化して得られた配列表の配列番号2に記載のペプチドの、MALDI-TOFMSスペクトルチャートの比較図である。

図5は、配列表の配列番号7に記載のホスホペプチド、及びそのホスホペプチドをフッ化水素-ピリジンによって脱リン酸化して得られた配列表の配列番号8に記載のペプチドの、MALDI-TOFMSスペクトルチャートの比較図である。

図6は、配列表の配列番号9に記載のホスホペプチド、及びそのホスホペプチドをフッ化水素-ピリジンによって脱リン酸化して得られた配列表の配列番号10に記載のペプチドの、MALDI-TOFMSスペクトルチャートの比較図である。

#### 発明を実施するための形態

本発明においては、フッ化水素、フッ化水素酸、及びフッ化水素含有化合物からなる群から選ばれる少なくとも1つを含む試剤を用い、試料のペプチドが有するリン酸基を脱離する。本発明において、この試剤は脱リン酸化剤としての役割を果たす。

リン酸化の形態としては、モノエステル化に限らない。つまり、リン酸モノエステル化、リン酸ジエステル化の形態が挙げられ、理論上、リン酸トリエステル化の形態も挙げられる。

本発明は化学的手法であるため、基質特異性や構造依存性を有する酵素を用いた手法とは異なりペプチドの種類に関係なく脱リン酸化が完全に進行する。従って、どのような種類のペプチドであっても適応できるという利点がある。

本発明の方法においては、前記試剤とペプチドとを反応させる。試剤には、フッ化水素、フッ化水素酸、及びフッ化水素含有化合物からなる群から選ばれる少なくとも1つが含まれる。フッ化水素含有化合物としては、フッ化水素－ピリジン等が挙げられる。この試剤は、無溶媒又は溶液で用いることができる。

また反応は、液相反応でも気相反応でも良い。

試剤は、フッ化水素、フッ化水素酸、及びフッ化水素含有化合物からなる群から1種を選択して用いても良いし、2種を選択し組み合わせて用いても良い。

フッ化水素、フッ化水素酸、及びフッ化水素含有化合物からなる群から1種を選択して用いる場合、試剤は、含まれるフッ化水素、フッ化水素酸中のフッ化水素、又はフッ化水素含有化合物中のフッ化水素の量が、前記試剤に対し好ましくは10重量%～100重量%、より好ましくは10～80重量%、更に好ましくは10～70重量%となるように用いる。

すなわち、フッ化水素を選択する場合は、試剤を、無溶媒のフッ化水素（100重量%）、又はフッ化水素を含む溶液として用いることができる。フッ化水素を含む溶液は、フッ化水素の量が試剤に対し好ましくは10重量%以上、100重量%未満、より好ましくは10～80重量%、更に好ましくは10～70重量%となるように用いる。本明細書においては、フッ化水素を含む溶液のうち特に水溶液のものを別段にフッ化水素酸として記載する。フッ化水素酸を選択する場合は、試剤を、フッ化水素酸、又はフッ化水素酸を含む溶液として用いることができる。この場合、フッ化水素酸中のフッ化水素の量が、試剤に対して好ましくは10重量%以上、100重量%未満、より好ましくは10～80重量%、更に好ましくは10～70重量%となるように用いる。また、フッ化水素含有化合物を選択する場合は、試

剤を、無溶媒のフッ化水素含有化合物、又はフッ化水素含有化合物を含む溶液として用いることができる。無溶媒のフッ化水素含有化合物は、含有フッ化水素が好ましくは10重量%以上、100重量%未満、より好ましくは10～80重量%、更に好ましくは10～70重量%のものをを用いる。フッ化水素含有化合物を含む溶液は、試剤に対してフッ化水素含有化合物中のフッ化水素の量が好ましくは10重量%以上、100重量%未満、より好ましくは10～80重量%、更に好ましくは10～70重量%となるように用いる。

フッ化水素、フッ化水素酸、及びフッ化水素含有化合物からなる群から2種を選択し組み合わせて用いる場合、フッ化水素とフッ化水素酸以外の組み合わせ、すなわち、フッ化水素及びフッ化水素含有化合物、又はフッ化水素酸及びフッ化水素含有化合物の組み合わせが可能である。この場合、試剤は、無溶媒で、又は溶液で用いることができる。いずれの場合も、フッ化水素及びフッ化水素含有化合物中のフッ化水素、又はフッ化水素酸中のフッ化水素及びフッ化水素含有化合物中のフッ化水素の合計量が、試剤全体に対して好ましくは10～100重量%、より好ましくは10～80重量%、更に好ましくは10～70重量%となるように用いる。

上記範囲の濃度にするることにより、脱リン酸化反応が十分に進行する。10重量%より少ないと、脱リン酸化が完結しないことがある。

ペプチドの量に対する試剤の量は特に限定されないが、試剤に含まれるフッ化水素、フッ化水素酸中のフッ化水素、及びフッ化水素含有化合物中のフッ化水素の合計量を、ペプチドの量に対して例えば10～100000重量%用いることができる。

本発明における反応温度は、-10～50℃が好ましく、0～25℃がより好ましい。上記範囲の温度にするることにより、脱リン酸化反応が十分に進行する。-10℃より低い温度では、脱リン酸化反応の進行が極めて遅くなる傾向にある。50℃より高い温度では、副生成物が増加する傾向にある。

本発明における反応時間は特に限定されないが、例えば10分～5時間で反



応行うことができる。

上述のようにして、ホスホペプチドのリン酸基が脱離されたペプチドを得る。なお、この方法ではペプチド結合はインタクトに保たれる。

本発明のペプチドのリン酸基を脱離する方法を用いると、ペプチドの解析を効率よく行うことができる。

例えば、上述のようにしてリン酸基の脱離を行ったペプチドを、そのままか、又は必要に応じて断片化した後、種々の分析法によって解析することができる。あるいは、ホスホペプチドを必要に応じ断片化した後にリン酸基の脱離を行い、その後、種々の分析法によって解析しても良い。分析法としては、質量分析法を用いることが好ましい。ペプチドの解析方法の一例として、ペプチドを断片化した後に質量分析を行う場合は、例えば次のようにして解析することができる。

まず、ホスホペプチドを酵素消化等により断片化し、得られたホスホペプチド断片混合物のマススペクトルを測定する。次いで、脱リン酸化反応を行い、得られたペプチド断片混合物のマススペクトルを測定する。双方のマススペクトルを比較し、変化したスペクトルピークから、修飾を受けていたペプチド断片を判定することができる。また、変化した質量の差から、そのリン酸基を判定することができる。例えば、リン酸モノエステル化されたアミノ酸残基を持つペプチドを本発明に従って処理した場合、リン酸基1個あたり分子量が80減少したペプチドのピークが検出される。

次に、修飾されているペプチド断片のタンデムマスを測定することによって、修飾を受けているアミノ酸残基及びその部位を決定することができる。

また、質量分析には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)及び飛行時間型質量分析法(TOFMS)を用いることが好ましい。

上記した本発明の方法を用いると、従来の酵素方法では脱リン酸化が不完全なために解析が困難であったペプチドの同定、及びその機能を明らかにすることが容易になる。すなわち、本発明の方法は、リン酸化タンパク質のプロテオーム解析により広く応用することができる。本発明によって明らかにされたタンパク質が特定の疾患に関与するものである場合、該タンパク質を標的として特異的に作用し、その機能を効果的に制御する化合物をコンピュータで理論的にデザインすることによって、医薬品候補化合物を創出することができる。また、該タンパク質をコードする遺伝子の情報を見出し、該遺伝子の発現を特異的に制御する物質を医薬品候補化合物として創出することができる。本発明の方法は、これら医薬品候補化合物の創出をより効率的なものにすることができる。

#### 実施例

以下に実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。以下において、「%」は特に断りのない限り、すべて重量基準である。

リン酸化を受け得るアミノ酸残基は、主としてセリン、スレオニン及びチロシンの3種であるため、まず、次の3種のホスホペプチドについてフッ化水素(HF)による脱リン酸化を行った。

1. WAGGDAPSGE (配列表の配列番号1) (セリン残基がリン酸化されたペプチド)
2. TRDIPYETDYRK (配列表の配列番号3) (チロシン残基がリン酸化されたペプチド)
3. GFEP TVPETG-NH<sub>2</sub> (配列表の配列番号5) (スレオニン残基がリン酸化されたペプチド)

## 〔実施例 1〕

アミノ酸配列がWAGGDAPSGE（配列表の配列番号1）であるホスホペプチド（アメリカン・ペプチド・カンパニー社製、カイウサギ（*Oryctolagus cuniculus*）のデルタ睡眠誘発ペプチド（Delta Sleep Inducing Peptide; DSIP））を用いた。このホスホペプチドはセリン残基がリン酸化されており、リン酸化セリン残基をpSで表している。

凍結乾燥させた配列番号1のホスホペプチド100 $\mu$ gに50%フッ化水素酸（水溶液）50 $\mu$ lを氷冷下で加え、0℃で3時間反応させた。ドラフト中で反応溶液にN<sub>2</sub>気流を吹き付けて蒸発・乾固した。得られた残渣を水100 $\mu$ lに溶解し、MALDI-TOFMS（（株）島津製作所製、AXIMA-CFR）を用いて測定した。

図1は、上記反応条件（50%HF、0℃、3時間(3hr)）により脱リン酸化が起こってアミノ酸配列がWAGGDASGE（配列表の配列番号2）のペプチドが得られたことを確認するために、得られたマスペクトルチャートと他のスペクトルチャートとを比較したものである。上段は、上記反応による生成物のスペクトルチャート（シグナル強度：240mV）、中段は、別途調製された配列番号2と同じ配列を有するペプチドのスペクトルチャート（シグナル強度：1498mV）、下段は、ホスホペプチドWAGGDAPSGE（配列表の配列番号1）のスペクトルチャート（シグナル強度：469mV）である。図1中のスペクトルチャートは全て、横軸にイオンの質量／電荷（Mass/Charge (m/z)）、縦軸にイオンの相対強度（Int.）を表す。

上段のスペクトルチャートにおいては、(m/z)=849.39 (M<sup>+</sup>)の分子イオンピークが検出された。この分子イオンピークは、下段のスペクトルチャートで検出された(m/z)=929.34 (M<sup>+</sup>)の分子イオンピークより分子量が80小さい。この差は、ホスホペプチドの分子量と、それを脱リン酸化する

ことによって得られるペプチドの分子量との差に相当する。さらに、上段のスペクトルチャートは、中段のスペクトルチャートと良い一致を示した。これらのことから、副反応を起こすことなく目的の脱リン酸化が行われたことが分かった。

### 〔実施例 2〕

アミノ酸配列が TRD I p Y E T D Y Y R K (配列表の配列番号 3) であるホスホペプチド (シグマ社製、ヒト (Homo sapiens) のインスリンレセプター 1142-1153 (Insulin receptor 1142-1153)) を用いた。このホスホペプチドは N 末端から 5 番目のチロシン残基がリン酸化されており、リン酸化チロシン残基を p Y で表している。

凍結乾燥させた配列番号 2 のホスホペプチド 100  $\mu$ g に 50 % フッ化水素酸 (水溶液) 50  $\mu$ l を氷冷下に加え、0℃で 3 時間反応させた。ドラフト中で反応溶液に N<sub>2</sub> 気流を吹き付けて蒸発・乾固した。得られた残渣を水 100  $\mu$ l に溶解し、MALDI-TOFMS ((株) 島津製作所製、AXIMA-CFR) を用いて測定した。

図 2 は、上記反応条件 (50 % HF、0℃、3 時間 (3hr)) により脱リン酸化が起こってアミノ酸配列が TRD I Y E T D Y Y R K (配列表の配列番号 4) のペプチドが得られたことを確認するために、得られたマスペクトルチャートと他のスペクトルチャートとを比較したものである。上段は、上記反応による生成物のスペクトルチャート (シグナル強度: 253 mV)、中段は、別途調製された配列番号 4 と同じ配列を有するペプチドのスペクトルチャート (シグナル強度: 123 mV)、下段は、ホスホペプチド TRD I p Y E T D Y Y R K (配列表の配列番号 3) のスペクトルチャート (シグナル強度: 123 mV) である。図 2 中のスペクトルチャートは全て、横軸にイオンの質量/電荷 (

Mass/Charge ( $m/z$ )), 縦軸にイオンの相対強度 (Int.) を表す。

上段のスペクトルチャートにおいては、 $(m/z) = 1622.76$  ( $M^+$ ) の分子イオンピークが検出された。この分子イオンピークは、下段のスペクトルチャートで検出された  $(m/z) = 1072.79$  ( $M^+$ ) の分子イオンピークより分子量が 80 小さい。この差は、ホスホペプチドの分子量と、それを脱リン酸化することによって得られるペプチドの分子量との差に相当する。さらに、上段のスペクトルチャートは、中段のスペクトルチャートと良い一致を示した。これらのことから、副反応を起こすことなく目的の脱リン酸化が行われたことが分かった。

### 【実施例 3】

アミノ酸配列が  $GFEpTVPETG-NH_2$  (配列表の配列番号 5) であるホスホペプチドを合成した。このホスホペプチドは N 末端から 4 番目のスレオニン残基がリン酸化されており、リン酸化スレオニン残基を  $pT$  で表している。さらにこのホスホペプチドは、C 末端のグリシン残基がアミド化されており、アミド化されたグリシン残基を  $G-NH_2$  で表している。

凍結乾燥させた配列番号 3 のホスホペプチド  $100 \mu g$  に 50% フッ化水素酸 (水溶液)  $50 \mu l$  を室温下に加え、室温で 3 時間反応させた。ドラフト中で反応溶液に  $N_2$  気流を吹き付けて蒸発・乾固した。得られた残渣を水  $100 \mu l$  に溶解し、MALDI-TOFMS ((株) 島津製作所製、AXIMA-CFR) を用いて測定した。

図 3 は、上記反応条件 (50% HF、室温 (RT)、3 時間 (3hr)) により脱リン酸化が起こってアミノ酸配列が  $GFE TVPETG-NH_2$  (配列表の配列番号 6) のペプチドが得られたことを確認するために、得られたマスペクトルチャートと他のスペクトルチャートとを比較したものである。なお、配列番号

6 のペプチドは、アミド化されている C 末端のグリシンを  $G-NH_2$  で表している。上段は、上記反応による生成物のスペクトルチャート（シグナル強度：40 mV）、中段は、別途合成した配列番号 6 と同じ配列を有するペプチドのスペクトルチャート（シグナル強度：325 mV）、下段は、ホスホペプチド  $GFEpTVPETG-NH_2$ （配列表の配列番号 5）のスペクトルチャート（シグナル強度：177 mV）である。図 3 中のスペクトルチャートは全て、横軸にイオンの質量／電荷（Mass/Charge ( $m/z$ )), 縦軸にイオンの相対強度（Int.）を表す。

上段のスペクトルチャートにおいては、 $(m/z) = 973.86 (M^+ + K)$ ,  $957.90 (M^+ + Na)$ ,  $935.52 (M^+ + H)$  の分子イオンピークが検出された。これら分子イオンピークは、下段のスペクトルチャートで検出された  $(m/z) = 1053.64 (M^+ + K)$ ,  $1037.65 (M^+ + Na)$ ,  $1015.66 (M^+ + H)$  の分子イオンピークより分子量がそれぞれ 80 小さい。この差は、ホスホペプチドの分子量と、それを脱リン酸化することによって得られるペプチドの分子量との差に相当する。さらに、上段のスペクトルチャートは、中段のスペクトルチャートと良い一致を示した。これらのことから、副反応を起こすことなく目的の脱リン酸化が行われたことが分かった。

さらに、次の 3 種のホスホペプチドについて、フッ化水素-ピリジン（HF-Py）による脱リン酸化を行った。

4.  $WAGGDAPSGE$ （配列表の配列番号 1）（セリン残基がリン酸化されたペプチド）

5.  $Ac-IpYGEF-NH_2$ （配列表の配列番号 7）（チロシン残基がリン酸化されたペプチド）

6.  $GFETVPEpTG-NH_2$ （配列表の配列番号 9）（スレオニン残基がリン酸化されたペプチド）

## [実施例 4]

実施例 1 で用いたのと同じ、アミノ酸配列が W A G G D A p S G E (配列表の配列番号 1) のホスホペプチドを用いた。

凍結乾燥させた配列番号 1 のホスホペプチド  $100\mu\text{l}$  に 70% フッ化水素-ピリジン  $50\mu\text{l}$  を氷冷下で加えて溶解し、 $0^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。反応溶液を真空ポンプ減圧下で濃縮乾固した。得られた残渣を水  $20\mu\text{l}$  に溶解し、ZipTip (ミリポア社製) による処理を行った後、MALDI-TOF MS ((株) 島津製作所製、AXIMA-CFR) を用いて測定した。

図 4 上段は、上記反応条件 (70% HF-Py、 $0^\circ\text{C}$  (0 deg.C)、1 時間 (1hr)) による脱リン酸化によって得られた、アミノ酸配列が W A G G D A S G E (配列表の配列番号 2) のペプチドのスペクトルチャート (シグナル強度: 130 mV) を示す。また、図 4 下段は、ホスホペプチド W A G G D A p S G E (配列表の配列番号 1) のスペクトルチャート (シグナル強度: 525 mV) を示す。図 4 中のスペクトルチャートは全て、横軸にイオンの質量/電荷 (Mass/Charge ( $m/z$ ))、縦軸にイオンの相対強度 (Int.) を表す。

上段のスペクトルチャートにおいては、( $m/z$ ) = 849.36 ( $M^+$ ) の分子イオンピークが検出された。この分子イオンピークは、下段のスペクトルチャートで検出された ( $m/z$ ) = 929.34 ( $M^+$ ) の分子イオンピークより分子量が 80 小さい。この差は、ホスホペプチドの分子量と、それを脱リン酸化することによって得られるペプチドの分子量との差に相当する。このことから、副反応を起こすことなく目的の脱リン酸化が行われたことが分かった。

## [実施例 5]

アミノ酸配列が A c - I p Y G E F - N H <sub>2</sub> (配列表の配列番号 7) であるホスホペプチドを合成した。このホスホペプチドは N 末端から 2 番目のチロシ

ン残基がリン酸化されており、リン酸化チロシン残基を pY で表している。またこのホスホペプチドは、N末端のイソロイシン残基がアセチル化されており、アセチル化されたイソロイシン残基を Ac-1 で表している。さらにこのホスホペプチドはC末端のフェニルアラニン残基がアミド化されており、アミド化されたフェニルアラニン残基を F-NH<sub>2</sub> で表している。

脱リン酸化すべきホスホペプチドに上記配列番号7のペプチドを用いた以外は、実施例4と同様の操作を行い、MALDI-TOFMS ((株)島津製作所製、AXIMA-CFR) を用いて測定した。

図5上段は、実施例5の反応条件(70%HF-Py、0℃(0 deg.C)、1時間(1hr))による脱リン酸化によって得られた、アミノ酸配列がAc-1 pYGEF-NH<sub>2</sub> (配列表の配列番号8)のペプチドのスペクトルチャート(シグナル強度: 68 mV)を示す。なお、配列番号8のペプチドは、アセチル化されているN末端のイソロイシンをAc-1、アミド化されているC末端のフェニルアラニンをF-NH<sub>2</sub>で表している。また、図5下段は、ホスホペプチドAc-1 pYGEF-NH<sub>2</sub> (配列表の配列番号7)のスペクトルチャート(シグナル強度: 119 mV)を示す。図5中のスペクトルチャートは全て、横軸にイオンの質量/電荷(Mass/Charge (m/z))、縦軸にイオンの相対強度(Int.)を表す。

上段のスペクトルチャートにおいては、(m/z)=707.36 (M<sup>+</sup>+K), 691.38 (M<sup>+</sup>+Na)の分子イオンピークが検出された。これら分子イオンピークは、下段のスペクトルチャートで検出された(m/z)=787.42 (M<sup>+</sup>+K), 771.47 (M<sup>+</sup>+Na)の分子イオンピークより分子量がそれぞれ80小さい。この差は、ホスホペプチドの分子量と、それを脱リン酸化することによって得られるペプチドの分子量との差に相当する。このことから、副反応を起こすことなく目的の脱リン酸化が行われたことが分かった。



## 〔実施例 6〕

アミノ酸配列が GFETVPEpTG-NH<sub>2</sub> (配列表の配列番号 9) であるホスホペプチドを合成した。このホスホペプチドは N 末端から 8 番目のスレオニン残基がリン酸化されており、リン酸化スレオニン残基を pT で表している。またこのホスホペプチドは C 末端のグリシン残基がアミド化されており、アミド化されたグリシン残基を G-NH<sub>2</sub> で表している。

脱リン酸化すべきホスホペプチドに上記配列番号 9 のペプチドを用いた以外は、実施例 4 と同様の操作を行い、MALDI-TOFMS ((株) 島津製作所製、AXIMA-CFR) を用いて測定した。

図 6 上段は、実施例 6 の反応条件 (70% HF-Py, 0°C (0 deg. C)、1 時間 (1hr)) による脱リン酸化によって得られた、アミノ酸配列が GFETVPEpTG-NH<sub>2</sub> (配列表の配列番号 10) のペプチドのスペクトルチャート (シグナル強度: 5.6 mV) を示す。なお、配列番号 10 のペプチドは、アミド化されている C 末端のグリシンを G-NH<sub>2</sub> で表している。また、図 6 下段は、ホスホペプチド GFETVPEpTG-NH<sub>2</sub> (配列表の配列番号 9) のスペクトルチャート (シグナル強度: 208 mV) を示す。図 6 中のスペクトルチャートは全て、横軸にイオンの質量/電荷 (Mass/Charge (m/z))、縦軸にイオンの相対強度 (Int.) を表す。

上段のスペクトルチャートにおいては、(m/z) = 973.50 (M<sup>+</sup>+K), 957.54 (M<sup>+</sup>+Na) の分子イオンピークが検出された。これら分子イオンピークは、下段のスペクトルチャートで検出された (m/z) = 1053.64 (M<sup>+</sup>+K), 1037.65 (M<sup>+</sup>+Na) の分子イオンピークより分子量がそれぞれ 80 小さい。この差は、ホスホペプチドの分子量と、それを脱リン酸化することによって得られるペプチドの分子量との差に相当する。このことから、副反応を起こすことなく目的の脱リン酸化が行われたことが分かった。

以上のホスホペプチドを用いた実施例全てにおいて、副反応を起こすことなく脱リン酸化が行われた。このように本発明の方法は、反応の特異性や構造依存性がなく、どのようなペプチドに対しても適用することができる。

#### 〔実施例 7〕

上記実施例 1 ～ 6 で述べたモデルペプチドに加え、 $\alpha$ -カゼイン（牛乳（bovine milk）由来）を用いた脱リン酸化を行った。 $\alpha$ -カゼインを定法によりトリプシン消化して消化断片の混合物を得、次いで I M A C 法（G a カラム）によりホスホペプチドを濃縮した。このサンプルを 50% フッ化水素酸（水溶液）50  $\mu$ l で処理し、0℃、3 時間で、脱リン酸化を行った。その結果、M A L D I - T O F M S スペクトル上の (m/z) が 2000 までの範囲において (m/z) = 1661. 2, 1952. 3 の 2 本のホスホペプチド由来のピークが、フッ化水素処理後それぞれ (m/z) = 1580. 9, 1872. 0 へと変化した。処理前と処理後の質量数の差は 80 であるので、各々のフラグメントは 1 ヶ所リン酸化されていたことが分かった。

上記実施例では、5 種のモデルペプチド及び  $\alpha$ -カゼインの脱リン酸化を示した。しかしながら、本発明は、これらに限定されることなく、全てのペプチド、タンパク質に適用することができる。そのため、前述の実施例はあらゆる点で単なる例示に過ぎず、限定的に解釈してはならない。さらに、特許請求の範囲の均等範囲に属する変更は、全て本発明の範囲内のものである。

なお、配列表フリーテキスト（人工配列の記載（Description of Artificial Sequence））において、配列番号 2 はデルタ睡眠誘発ペプチドを脱リン酸化したペプチドであり、配列番号 4 はインスリンレセプター 1142-1153 を脱リン酸化したペプチドであり、配列番号 5、7、9 は合成ホスホペプチドであ

り、配列番号 6、8、10 は合成ホスホペプチド 5、7、9 をそれぞれ脱リン酸化したペプチドである。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、酵素を用いずに化学的処理によってペプチドのリン酸基を脱離する方法及びその方法を用いてペプチドの解析を効率良く行う方法が提供される。

## 請 求 の 範 囲

1. フッ化水素、フッ化水素酸、及びフッ化水素含有化合物からなる群から選ばれる少なくとも1つを含む試剤を用いてペプチドのリン酸基を脱離する方法。

2. 前記フッ化水素含有化合物がフッ化水素-ピリジンである、請求の範囲第1項に記載のペプチドのリン酸基を脱離する方法。

3. 前記試剤に含まれる前記フッ化水素、前記フッ化水素酸中のフッ化水素、及び前記フッ化水素含有化合物中のフッ化水素の合計量が、前記試剤に対し10～100重量%である、請求の範囲第1項に記載のペプチドのリン酸基を脱離する方法。

4. 脱離の反応温度が-10～50℃である、請求の範囲第1項に記載のペプチドのリン酸基を脱離する方法。

5. 脱離の反応を液相反応又は気相反応で行う、請求の範囲第1項に記載のペプチドのリン酸基を脱離する方法。

6. 請求の範囲第1項に記載のペプチドのリン酸基を脱離する方法を用いたペプチドの解析方法。

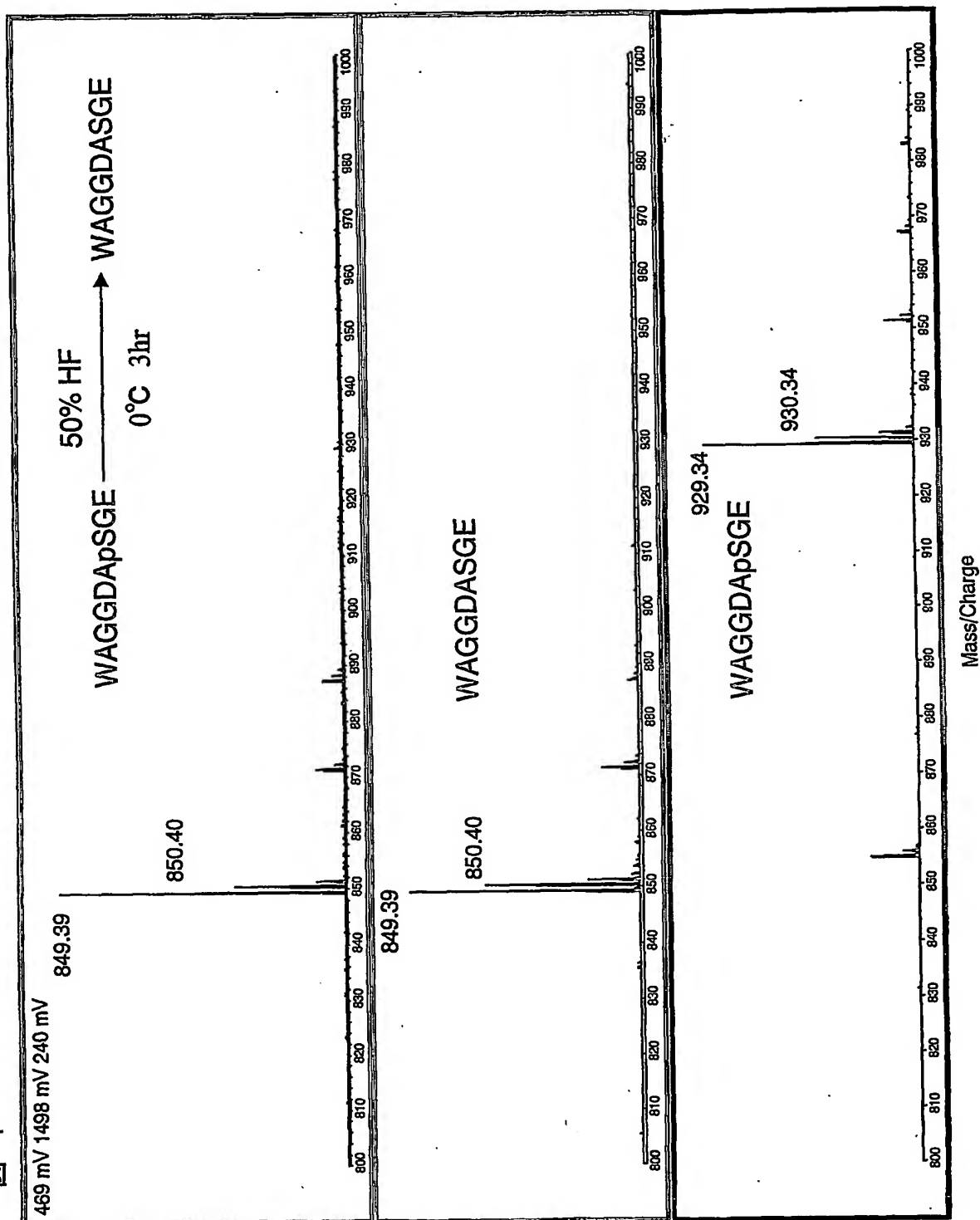
7. 質量分析を用いる、請求の範囲第6項に記載のペプチドの解析方法。

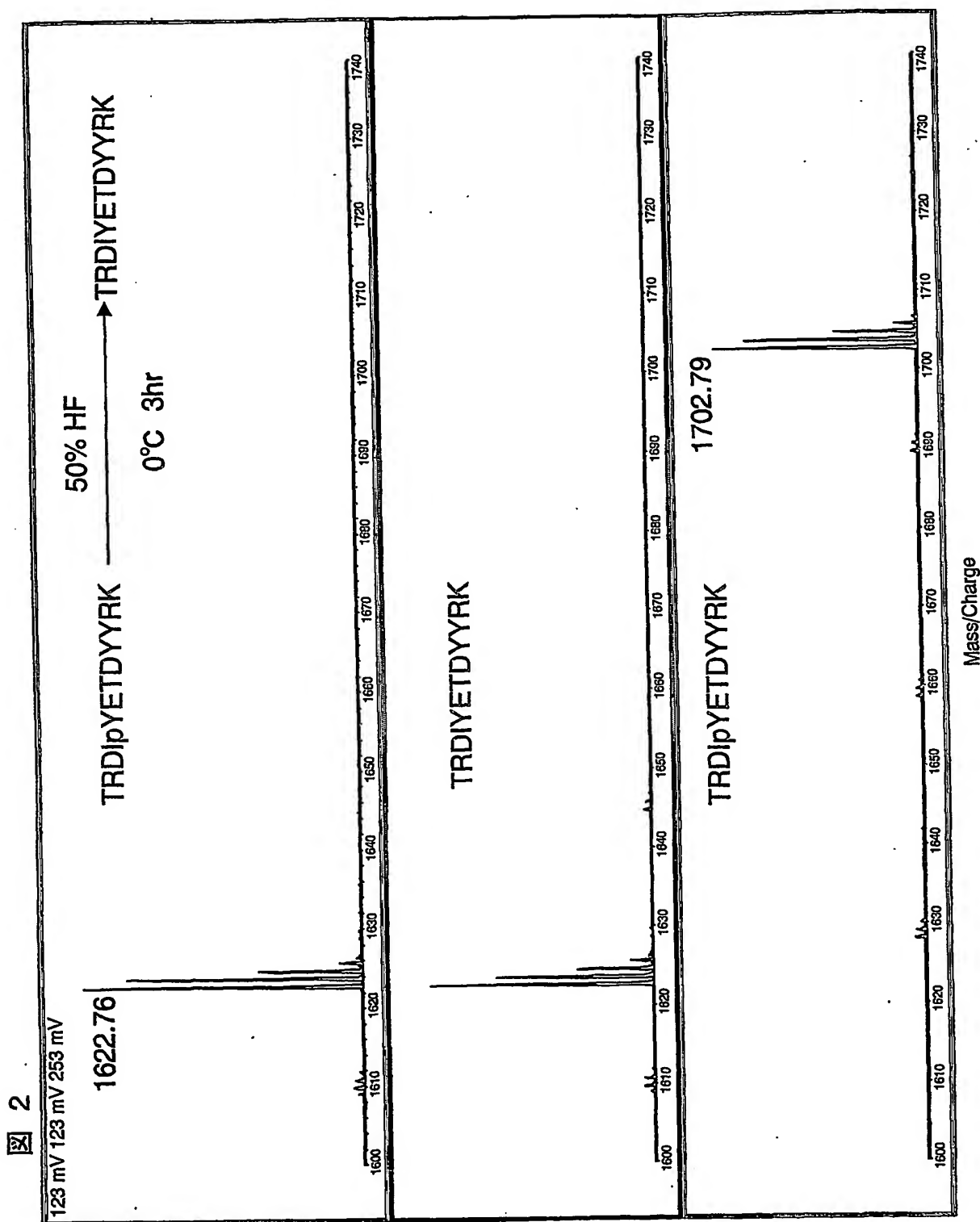
8. マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)及び飛行時間型質量分析法(TOFMS)を用いる、請求の範囲第7項に記載のペプチドの解析方法。

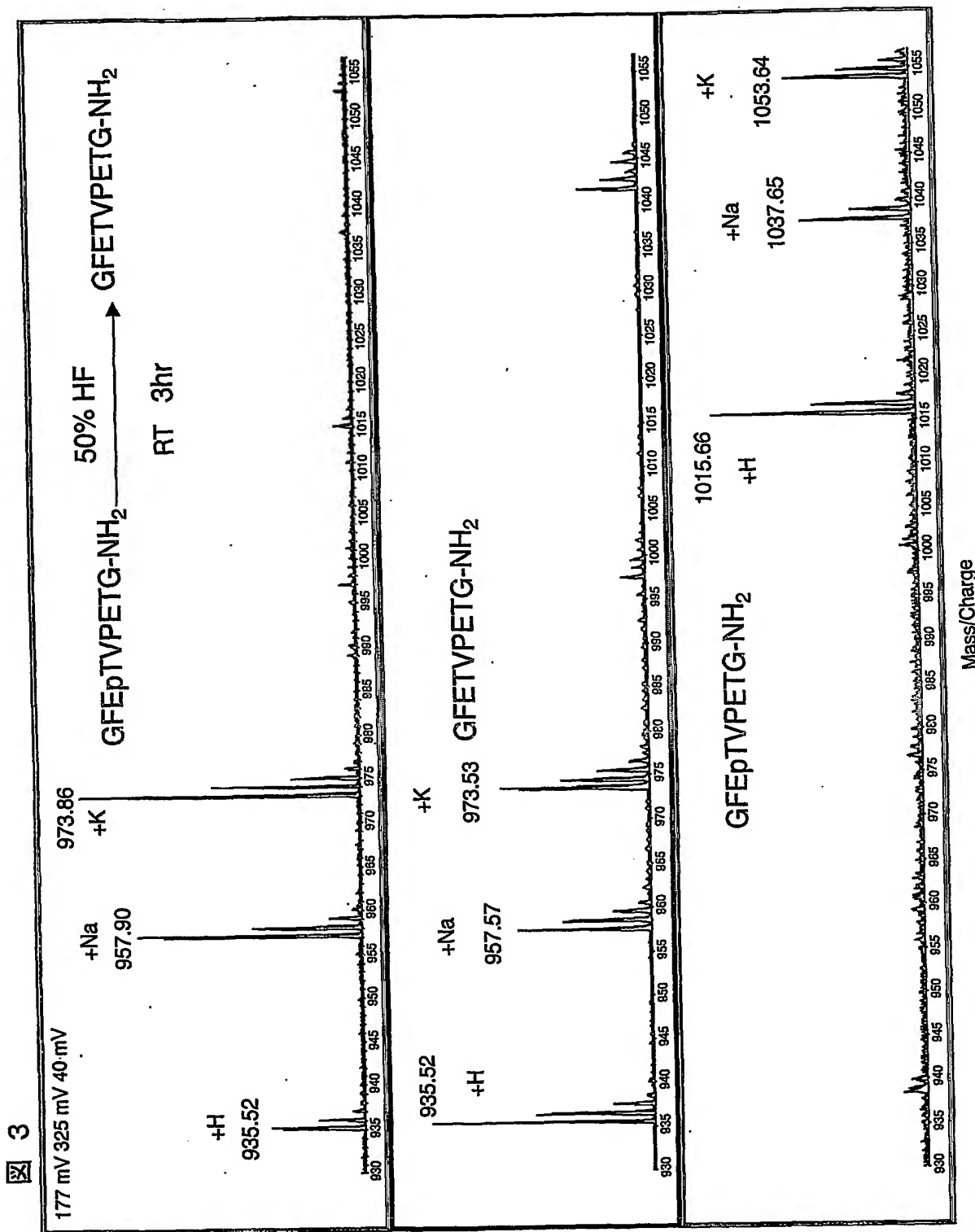
9. フッ化水素、フッ化水素酸、及びフッ化水素含有化合物からなる群から選ばれる少なくとも1つを含む試剤を用いてペプチドのリン酸基を脱離することで見出されるペプチドを含む新規化合物。

10. 請求の範囲第9項で得られた新規化合物から開発される医薬品候補化合物。

図 1

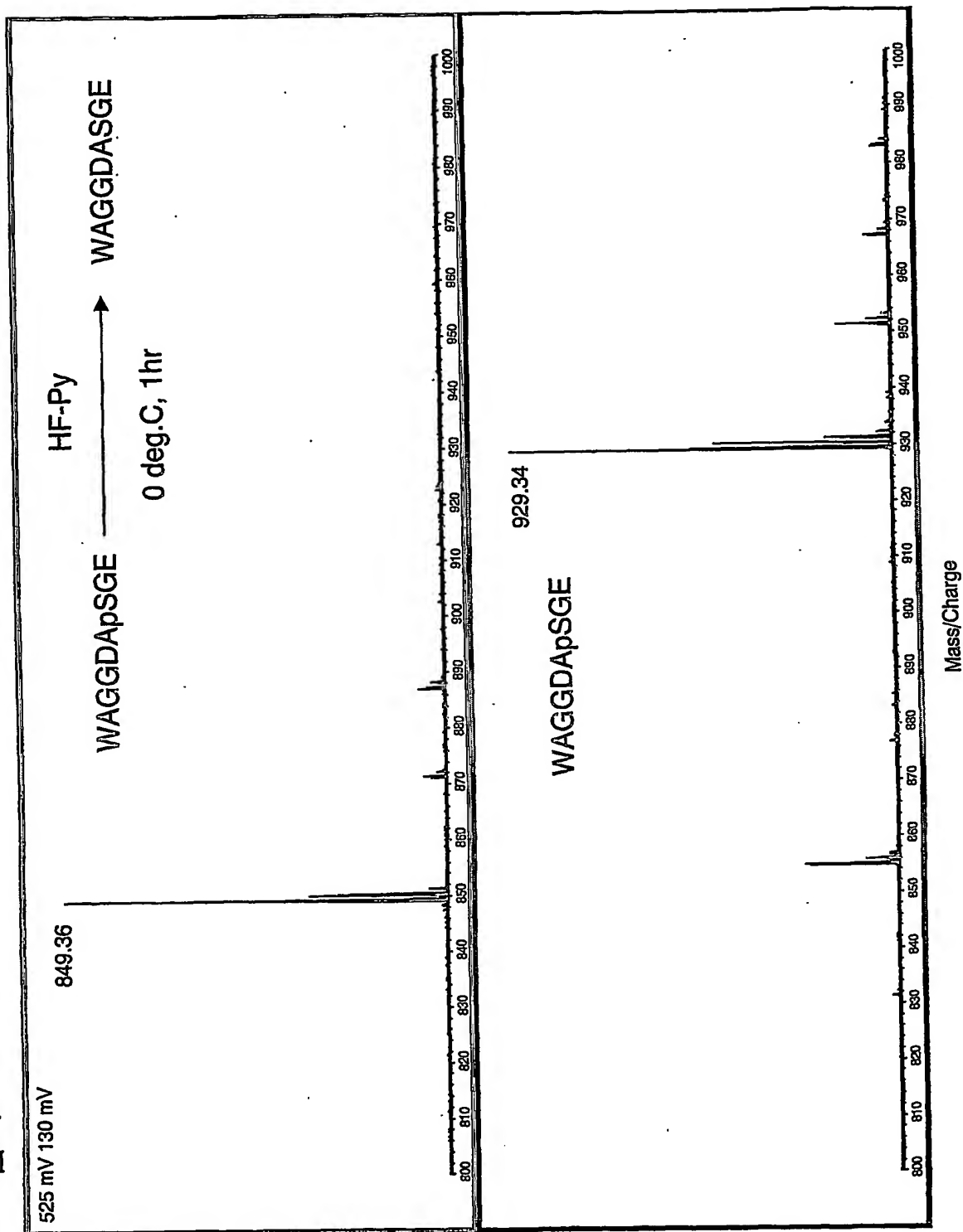






差替え用紙(規則26)

図 4





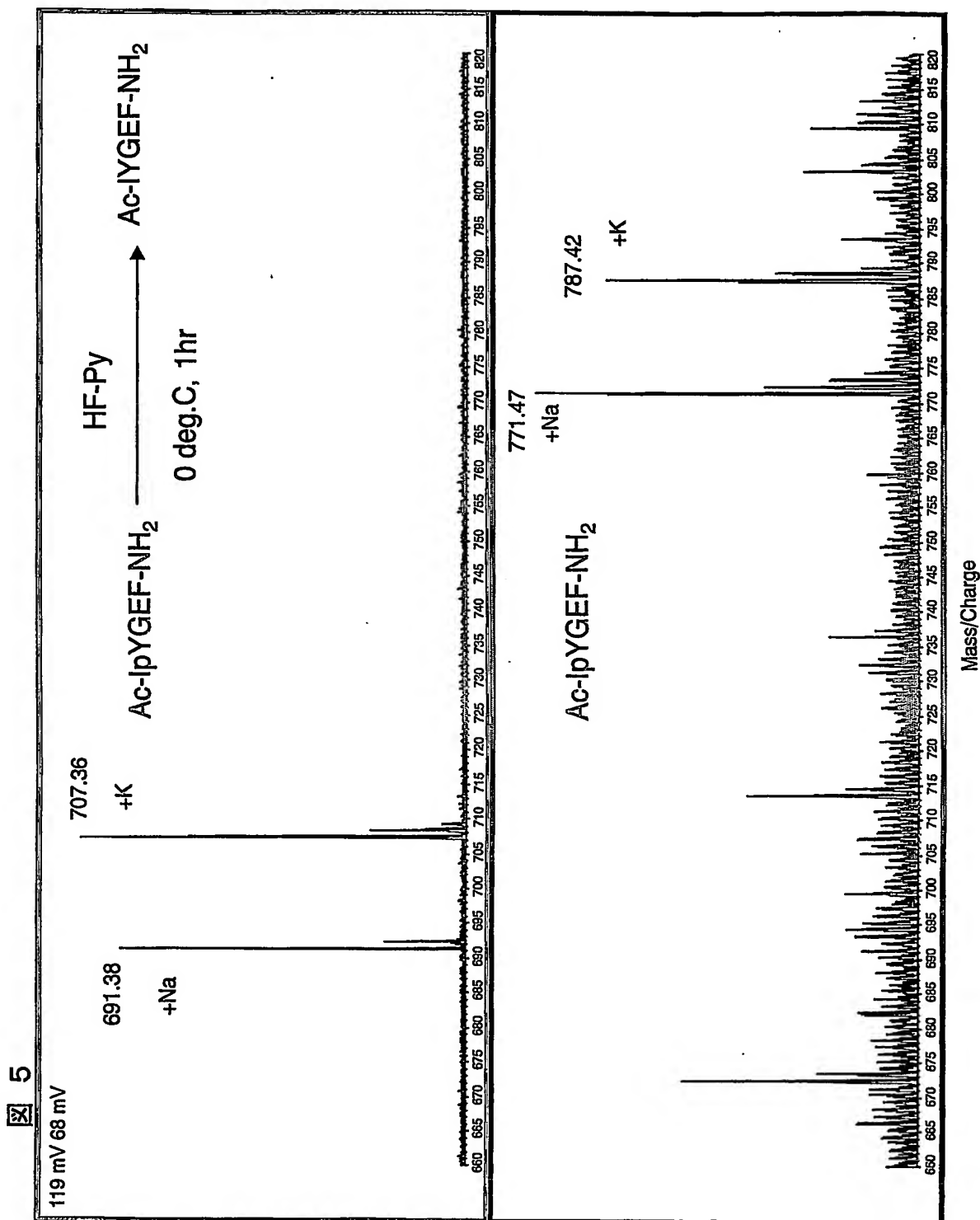
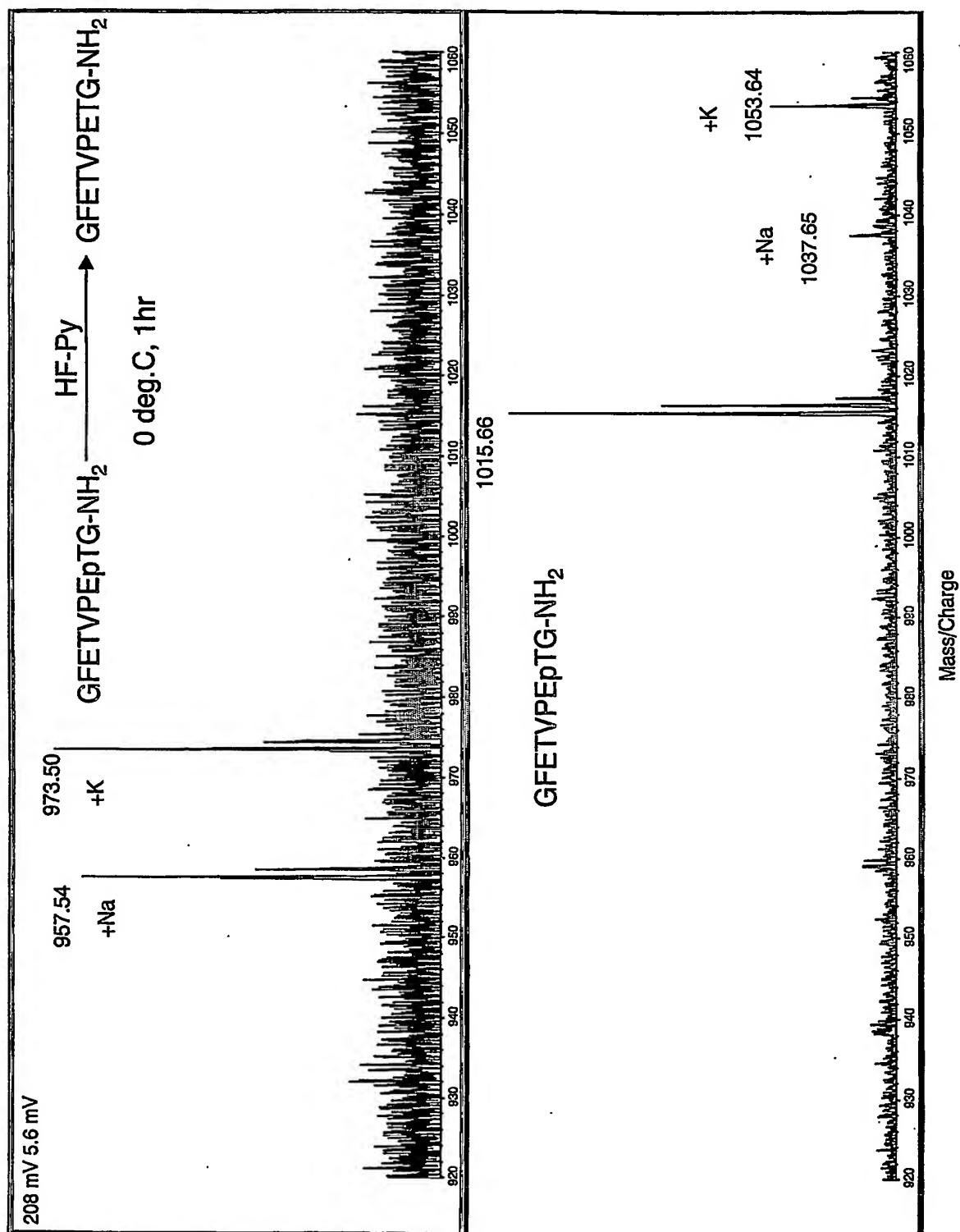


図 6



1 / 5

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; SHIMADZU CORPORATION

&lt;120&gt; method for eliminating phosphate group of peptide and method for analyzing peptide

&lt;130&gt; G103010 WO

&lt;150&gt; JP 2003-036472

&lt;151&gt; 2003-02-14

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Oryctolagus cuniculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (7)

&lt;223&gt; PHOSPHORYLATION

&lt;400&gt; 1

Trp Ala Gly Gly Asp Ala Ser Gly Glu

1

5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: dephosphorylated Delta Sleep Inducing Peptide

&lt;400&gt; 2

Trp Ala Gly Gly Asp Ala Ser Gly Glu

1

5

2 / 5

<210> 3  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)  
<223> PHOSPHORYLATION

<400> 3  
Thr Arg Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys  
1 5 10

<210> 4  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: dephosphorylated Insulin receptor 1142-1153

<400> 4  
Thr Arg Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys  
1 5 10

<210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic phosphopeptide

<220>  
<221> BINDING  
<222> (4)  
<223> PHOSPHORYLATION

3 / 5

<220>  
<221> BINDING  
<222> (9)  
<223> AMIDATION

<400> 5  
Gly Phe Glu Thr Val Pro Glu Thr Gly  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: dephosphorylated synthetic phosphopeptide

<220>  
<221> BINDING  
<222> (9)  
<223> AMIDATION

<400> 6  
Gly Phe Glu Thr Val Pro Glu Thr Gly  
1 5

<210> 7  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic phosphopeptide

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)  
<223> ACETYLATION

<220>

4 / 5

<221> BINDING  
<222> (5)  
<223> AMIDATION

<220>  
<221> BINDING  
<222> (2)  
<223> PHOSPHORYLATION

<400> 7  
Ile Tyr Gly Glu Phe  
1 5

<210> 8  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> BINDING  
<222> (1)  
<223> ACETYLATION

<220>  
<221> BINDING  
<222> (5)  
<223> AMIDATION

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: dephosphorylated synthetic phosphopeptide

<400> 8  
Ile Tyr Gly Glu Phe  
1 5

<210> 9  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

5 / 5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (8)

&lt;223&gt; PHOSPHORYLATION

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (9)

&lt;223&gt; AMIDATION

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic phosphopeptide

&lt;400&gt; 9

Gly Phe Glu Thr Val Pro Glu Thr Gly

1

5

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BINDING

&lt;222&gt; (9)

&lt;223&gt; AMIDATION

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: dephosphorylated synthetic phosphopeptide

&lt;400&gt; 10

Gly Phe Glu Thr Val Pro Glu Thr Gly

1

5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/04305

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K1/113, 7/06, 7/08, G01N33/68, 27/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K1/113, 7/06, 7/08, G01N33/68, 27/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, CA/REGISTRY/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$	Mark A. Smith et al., "Quantitative solubilization and analysis of in soluble paired helical filaments from Alzheimer disease", Brain Research, 1996, Vol.717, pages 99 to 108, full text; particularly, table 2	$\frac{1-5}{6-8}$
Y	JP 10-90226 A (Shimadzu Corp.), 10 April, 1998 (10.04.98), Full text (Family: none)	6-8
Y	WO 01/78106 A2 (Perceptive Biosystems, INC.), 18 October, 2001 (18.10.01), Full text & US 6545268 B1                      & EP 1303867 A2	6-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
01 July, 2003 (01.07.03)

Date of mailing of the international search report  
15 July, 2003 (15.07.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04305

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Jose M. Mercero et al., "Quantum Mechanical Calculations on Phosphate Hydrolysis Reactions", Journal of Computational Chemistry, 2000, Vol.21(1), pages 43 to 51, full text	1-8
A	GB 2000511 A (Hoffmann-la Roche AG.), 10 January, 1979 (10.01.79), Full text & US 4165312 A                      & DE 2828433 A & FR 2396016 A                      & JP 54-39050 A	1-8
A	Timothy O'Hare et al., "Intrinsic Kinase Activity of the Insulin Receptor", The Journal of Biological Chemistry, 1989, Vol.264(1), pages 602 to 610, full text	1-8
A	Richard A. et al., "Optimization of Coupling Methods for the Introduction of Mono-Benzyl Phosphate Esters of Fmoc Protected Phosphoamino Acids", Peptides: The Wave of the Future, 2001, pages 97 to 98; full text	1-8
A	Ann M. Edison et al., "Exploration of the Sequence Specificity of pp60 <sup>c-src</sup> Tyrosine Kinase", The Journal of Biological Chemistry, 1995, Vol.270(45), pages 27112 to 27115, full text	1-8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/04305

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 9-10

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning "a novel compound containing a peptide which is found out by eliminating a phosphate group of a peptide" and "a candidate compound for a drug developed from a novel compound" as described in the above claims, it is completely unknown what compounds other than (continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/04305

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

those specifically obtained are involved in the scopes thereof and what are not, even though the statement in the description is taken into consideration. Namely, the above claims are described in an extremely unclear manner. Such being the case no meaningful international search can be made on the above claims.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K1/113, 7/06, 7/08, G01N33/68, 27/62

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K1/113, 7/06, 7/08, G01N33/68, 27/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq  
CA/REGISTRY/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Mark A. Smith et al. "Quantitative solubilization and analysis of in soluble paired helical filaments from Alzheimer disease" Brain Resesarch, 1996, Vol. 717, p. 99-108, 文献全体, 特にTable2参照	1-5 6-8
Y	JP 10-90226 A (株式会社島津製作所) 1998. 04. 10, 文献全体参照, (ファミリーなし)	6-8
Y	WO 01/78106 A2 (Perseptive Biosystems, INC.) 2001. 10. 18, 文献全体参照, & US 6545268 B1 & EP 1303867 A2	6-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 07. 03

国際調査報告の発送日

15.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子



4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Jose M. Mercero et al. "Quantum Mechanical Calculations on Phosphate Hydrolysis Reactions" Journal of Computational Chemistry, 2000, Vol.21(1) p.43-51, 文献全体参照	1-8
A	GB 2000511 A (Hoffmann-la Roche AG) 1979.01.10, 文献全体参照, & US 4165312 A & DE 2828433 A & FR 2396016 A & JP 54-39050 A	1-8
A	Timothy O'Hare et al. "Intrinsic Kinase Activity of the Insulin Receptor" The Journal of Biological Chemistry, 1989, Vol.264(1) p.602-610, 文献全体参照	1-8
A	Richard A. et al. "Optimization of Coupling Methods for the Introduction of Mono-Benzyl Phosphate Esters of Fmoc Protected Phosphoamino Acids" Peptides: The Wave of the Future, 2001, p.97-98, 文献全体参照	1-8
A	Ann M. Edison et al. "Exploration of the Sequence Specificity of pp60 <sup>c-src</sup> Tyrosine Kinase" The Journal of Biological Chemistry, 1995, Vol.270(45), p.27112-27115, 文献全体参照	1-8

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 9-10 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
前記請求の範囲に記載の「ペプチドのリン酸基を脱離することで見出されるペプチドを含む新規化合物」及び「新規化合物から開発される医薬品候補化合物」について、明細書の記載を参酌しても、具体的に得られている化合物以外にどのような化合物が含まれ、どのような化合物が含まれないのが全く不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲については、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。